

**MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):**

(19)【発行国】  
日本国特許庁 (JP)

(19)[ISSUINGCOUNTRY]  
Japan Patent Office (JP)

(12)【公報種別】  
公開特許公報 (A)

Laid-open (Kokai) patent application number  
(A)

(11)【公開番号】  
特開平7-82172

(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER]  
Unexamined-Japanese-Patent No. 7-82172

(43)【公開日】  
平成7年(1995)3月28日

(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION]  
Heisei 7 (1995) March 28

(54)【発明の名称】  
創傷治療剤

(54)[TITLE]  
Wound healing agent

(51)【国際特許分類第6版】  
A61K 38/43 ADT  
AED  
C07K 14/745  
8318-4H 14/81  
14/81  
8318-4H

(51)[IPC]  
A61K38/43 ADT  
AED  
C07K14/745 8318-4H  
14/81 8318-4H

【FI】  
A61K 37/465 ADT  
AED

【FI】  
A61K37/465 ADT  
AED

【審査請求】 未請求

【EXAMINATIONREQUEST】 UNREQUESTED

【請求項の数】 9

【NUMBEROFCLAIMS】 9

【出願形態】 OL

【Application form】 OL

【全頁数】 8

【NUMBEROFPAGES】 8

(21)【出願番号】  
特願平5-230616

(21)[APPLICATIONNUMBER]  
Japanese Patent Application No. 5-230616

(22)【出願日】

(22)[DATEOFFILING]

平成5年(1993)9月17日

Heisei 5 (1993) September 17

## (71)[出願人]

## (71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

## 【識別番号】

000113137

## [IDCODE]

000113137

## 【氏名又は名称】

ヘキストジャパン株式会社

K.K., Hoechst Japan

## 【住所又は居所】

東京都港区赤坂8丁目10番16  
号

## [ADDRESS]

## (72)[発明者]

## (72)[INVENTOR]

## 【氏名】 小山 政義

Koyama Masayoshi

## 【住所又は居所】

埼玉県川越市鶴の湯1952番地31

## [ADDRESS]

## (72)[発明者]

## (72)[INVENTOR]

## 【氏名】 高橋 美樹子

Takahashi Mikiko

## 【住所又は居所】

埼玉県蓮田市綾瀬1番11号

## [ADDRESS]

## (72)[発明者]

## (72)[INVENTOR]

## 【氏名】 土井 一之

Doi Kazuyuki

## 【住所又は居所】

東京都武藏村山市大南5丁目19  
番地9

## [ADDRESS]

## (74)[代理人]

## (74)[PATENTAGENT]

## 【弁理士】

## [PATENTATTORNEY]

**【氏名又は名称】**  
高木 千嘉 (外2名)

Chika Takagi (et al.)

**(57)[要約]**

**(57)[SUMMARY]**

**【構成】**

キニノーゲンのフラグメント1、フラグメント2、フラグメント1・2より成る創傷治療剤。

**【効果】**

上記キニノーゲンのフラグメント1、フラグメント2及びフラグメント1・2は線維芽細胞の増殖促進活性を有するので創傷治療剤として有用である。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】**

キニノーゲンフラグメント1・2を有効成分とする創傷治療剤。

**【請求項2】**

キニノーゲンフラグメント1を有効成分とする創傷治療剤。

**【請求項3】**

キニノーゲンフラグメント2を有効成分とする創傷治療剤。

**【請求項4】**

配列番号:1のウシのキニノーゲンフラグメント1・2である請求項1の創傷治療剤。

**【請求項5】**

配列番号:2のウシのキニノーゲンフラグメント1である請求項2の創

**[SUMMARY OF THE INVENTION]**

The wound healing agent which consists of the fragment 1, the fragment 2, and fragment 1\*2 of a kininogen.

**[EFFECTS]**

Since the fragment 1, the fragment 2, and fragment 1\*2 of a said kininogen have growth promotion activity of a fibroblast, they are useful as a wound healing agent.

**[CLAIMS]**

**[CLAIM 1]**

The wound healing agent which has the kininogen fragment 1\*2 as an active ingredient.

**[CLAIM 2]**

The wound healing agent which has the kininogen fragment 1 as an active ingredient.

**[CLAIM 3]**

The wound healing agent which has the kininogen fragment 2 as an active ingredient.

**[CLAIM 4]**

The wound healing agent of Claim 1 which is the kininogen fragment 1\*2 of the cow of sequence number: 1.

**[CLAIM 5]**

The wound healing agent of Claim 2 which is the kininogen fragment 1 of the cow of sequence number: 2.

傷治療剤。

**[請求項6]**

配列番号:3のウシのキニノーゲンフラグメント2である請求項3の創傷治療剤。

**[請求項7]**

配列番号:4のヒトキニノーゲンのウシキニノーゲンフラグメント1・2に対応する部分ペプチドを有効成分とする創傷治療剤。

**[請求項8]**

配列番号:5のヒトキニノーゲンのウシキニノーゲンフラグメント1に対応する部分ペプチドを有効成分とする創傷治療剤。

**[請求項9]**

配列番号:6のヒトキニノーゲンのウシキニノーゲンフラグメント2に対応する部分ペプチドを有効成分とする創傷治療剤。

**【発明の詳細な説明】**

**[0001]**

**【産業上の利用分野】**

本発明は、キニノーゲンのフラグメント1・2及びその等価物を有効成分とする創傷治療剤に関する。

**[0002]**

**【従来の技術】**

キニノーゲンは血管拡張、血圧低下及び子宮平滑筋の収縮などの作用を有する生理活性ペプチド

**[CLAIM 6]**

The wound healing agent of Claim 3 which is the kininogen fragment 2 of the cow of sequence number: 3.

**[CLAIM 7]**

The wound healing agent which has as an active ingredient the partial peptide corresponded to the cow kininogen fragment 1\*2 of the human kininogen of sequence number: 4.

**[CLAIM 8]**

The wound healing agent which has as an active ingredient the partial peptide corresponded to the cow kininogen fragment 1 of the human kininogen of sequence number: 5.

**[CLAIM 9]**

The wound healing agent which has as an active ingredient the partial peptide corresponded to the cow kininogen fragment 2 of the human kininogen of sequence number: 6.

**[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]**

**[0001]**

**[INDUSTRIAL APPLICATION]**

This invention relates to the fragment 1\*2 of a kininogen, and the wound healing agent which has the equivalent as an active ingredient.

**[0002]**

**[PRIOR ART]**

A kininogen is early known as precursor protein of the kinin which is the biologically active peptide which has an effect of the vasodilation,

であるキニンの前駆体蛋白として早くから知られてきた。またキニノーゲン自体の働きとして、キニノーゲンが血液凝固因子の前駆体と複合体を形成し、血管内皮の傷害部位に沈着することで内因性の血液凝固を開始させる作用を有することが知られてきた。また最近になって、システィンプロデアーゼインヒビター活性がキニノーゲンのH-鎖領域に存在することが明らかにされている(Ohkubo et al., Biochemistry vol.23, p.5691 ~5697, 1984)。更にキニノーゲンは、炎症時に血中内で急激にその濃度が増加する急性期反応物質(acute phase reactant)のひとつであることも明らかにされ(Furuto-Kato et al., J. Biol. Chem. vol.260, p.12054 ~12059, 1985)、炎症に対する生体側の防御反応に関与していることが示唆されている。このようにキニノーゲンは、非常に多機能を有する蛋白質である。

### [0003]

キニノーゲンはラット、ウシ、ウマ及びヒトにおいて精製されており、その他の哺乳類の血液中にも広くみられる。主として、分子量が88~114Kdの高分子量キニノーゲン(high molecular weight-kininogen、又は、HMWキニノーゲン)と分子量が58~68Kdの低分子量キニノーゲン(low molecular weight-kininogen、又は、LMWキニノーゲン)に分けられる。それぞれのキニノーゲンの分子量は動物種によって少しづつ異なっている。これらのキニノーゲンは、主に肝臓で合成される。

a blood pressure decrease, and the contraction of a uterus smooth muscle etc.

Moreover, having the effect which starts the blood coagulation of an endogenous because a kininogen forms a composite with the precursor of a blood coagulation factor and deposits to the trauma site of a vascular endothelium as role of a kininogen itself is known.

Moreover, it recently clarifies that cystine protease inhibitor activity exists in H-chain area of a kininogen (Ohkubo et al., Biochemistry vol.23 p.5691- 5697 1984).

Furthermore, it also clarifies that a kininogen is the one of the acute phase reactants (acutephasereactant) which the concentration increases rapidly within blood at the time of inflammation (Furuto-Kato et al., J. Biol. Chem. vol.260 p.12054-12059 1985), participating in defense reaction by the side of the living body to inflammation is suggested.

Thus, a kininogen is a protein which has a multiple functions very much.

### [0003]

The kininogen is purified in the rat, the cow, the horse, and the human, it sees widely in the blood of the other mammal.

It is mainly divided into the macromolecular kininogen (high molecular weight-kininogen or HMW kininogen) of molecular weight 88-114Kd, and the low-molecular-weight kininogen (low molecular weight-kininogen or LMW kininogen) of molecular weight 58-68Kd.

The molecular weight of each kininogen changes little by little with animal species.

These kininogens are mainly synthesized by the liver.

It is secreted into blood from the liver, it is in a blood flow, and is distributed over the vascular system of the whole body.

Two or three places are cut also for any

肝臓から血液中に分泌され、血流にのって全身の血管系に分布する。いずれのキニノーゲンもカリクレイン様プロテアーゼにより2ヶ所又は3ヶ所切断され、種々のキニンを遊離する。

#### 【0004】

ウシのHMW-キニノーゲンは最初に精製され、その性質及びアミノ酸配列が調べられている。ウシHMW-キニノーゲンは、カリクレイン様プロテアーゼにより分解をうけ、キニン及びフラグメント1・2と呼ばれる2種のペプチドフラグメントを遊離し、残りはN末端側の重鎖フラグメント(H-鎖)とC末端側の軽鎖フラグメント(L-鎖)がジスルフィド結合で共有結合したキニンフリーキニノーゲンとなる。ウマHMW-キニノーゲンもウシと同様の分解をうけ、キニン及びフラグメント1・2の2種のペプチドフラグメントを遊離する。

#### 【0005】

他方、ヒト由来のHMW-キニノーゲンもカリクレイン様プロテアーゼ処理によりキニンを遊離する。しかし、ウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2に対応する部分は遊離されず、キニンフリーキニノーゲンのL-鎖のN末端に結合したままである。

#### 【0006】

ウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2は、最初のメチオニン残基を1番目としたとき、387番目のセリン残基から496番目のアルギニン残基までのアミノ酸残基にして110個の長さをもつペプチド

kininogen by kallikrein-like protease, various kinin is released.

#### 【0004】

The HMW-kininogen of a cow is purified initially, the character and amino acid sequence are investigated.

A cow HMW-kininogen receives a decomposition by kallikrein-like protease, two sorts of peptide fragments called a kinin and a fragment 1\*2 are released, the remainder serves as a kinin free kininogen which the heavy-chain fragment (H-chain) of a N terminal side and the light-chain fragment by the side of a C terminal (L-chain) covalent bonded by the disulfide bond.

A horse HMW-kininogen also receives the decomposition similar to a cow, and releases two sorts of peptide fragments, a kinin and fragment 1\*2.

#### 【0005】

On the other hand, the HMW-kininogen derived from a human also releases a kinin by kallikrein-like protease processing.

However, the part corresponded to the fragment 1\*2 of a cow HMW-kininogen does not release, but has been bonded with N terminal of L-chain of a kinin free kininogen.

#### 【0006】

The fragment 1\*2 of a cow HMW-kininogen is a peptide fragment which makes it the amino acid residue from the 387th serine residue to the 496th arginine residue, and has length of 110 piece, when the first methionine residue is made into the 1st.

Furthermore, by processing by kallikrein-like

フラグメントである。更に、長時間カリクレイン様プロテアーゼで処理することにより、アミノ酸残基にして69個のフラグメント1と41個のフラグメント2に分解される。

#### [0007]

フラグメント1・2は、非常にヒスチジン残基に富む塩基性のペプチドフラグメントである。特にフラグメント2においてはヒスチジン残基の含量は41残基中11個と多く、その他のリジン、アルギニン残基の如く塩基性アミノ酸残基の含量は合せて41残基中19個となり、一方、酸性アミノ酸残基はアスパラギン残基1個であることから、全体として著しくプラスに荷電した塩基性のフラグメントである。またフラグメント1でも、69個のアミノ酸残基中、ヒスチジンは11個を含む19個の塩基性アミノ酸残基を有する塩基性フラグメントである。

#### [0008]

HMW-キニノーゲンのフラグメント1・2の生理活性については、キニノーゲンが内因性の血液凝固を開始させる際、キニノーゲンと血液凝固因子前駆体の複合体を血管内皮下表面(subendothelial surface)の傷害部位に結合させる働きが予想されているのみで、その他のフラグメント1・2に関する機能は知られていないかった(Allen et al., Blood vol.70, p.1~15, 1987)。

#### [0009]

一方、創傷治療の過程において種々の成長因子が関与していることが知られている(Dijke et al.,

protease for a long time, it is made an amino acid residue and decomposes into the 69 piece fragment 1 and the 41-piece fragment 2.

#### [0007]

A fragment 1\*2 is a basic peptide fragment which is very rich in a histidine residue. Especially in the fragment 2, there are many contents of a histidine residue among 41 residues as 11 piece, the content of a basic amino acid residue becomes 19 piece among 41 in all residues like another lysine and arginine residue, on the other hand, since an acidic amino acid residue is 1 piece of asparagine residues, it is the basic fragment which carried out the charge to plus remarkably as a whole.

Moreover, the fragment 1 of histidine is also a basic fragment which has a 19-piece basic amino acid residue containing 11 piece among a 69-piece amino acid residue.

#### [0008]

About the biological activity of the fragment 1\*2 of a HMW-kininogen

When a kininogen starts the blood coagulation of an endogenous, only the role which combines the composite of a kininogen and a blood-coagulation-factor precursor with the trauma site of an subendothelial surface (subendothelial surface) was estimated, the function about the other fragment 1\*2 was not known.

(Allen et al., Blood vol.70,p.1-15,1987).

#### [0009]

On the other hand, it is known that the various growth factor is involving in the process of a wound treatment.

Biotechnology vol.7, p.793～798, 1989)。特に、TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) や PDGF (platelet-derived growth factor) は、線維芽細胞を増殖させ、障害部位へ細胞を誘引し、創傷の修復を促進することが知られている。しかし、キニノーゲンのフラグメント1・2が線維芽細胞を増殖させたり、創傷治療に効果があるという報告はこれまでなされていなかった。

#### [0010]

##### 【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の課題は創傷治療に対して効果のある新たな治療薬として用いることのできるペプチドを提供することである。より詳しくは、従来知られていた創傷治療効果が示唆されていた TGF- $\beta$ 、PDGF の如くそれ自体多機能を有する生理活性物質は創傷治療以外の望ましくない作用を有することも考えられるので、そのような副次的な活性を有せず、より創傷治療に特異的に作用するペプチドをこの目的に使用することが望まれていた。

#### [0011]

##### 【課題を解決するための手段】

ヒトを含む哺乳類動物の胎児及び新生児の血液中には、成長の激しい胎児及び新生児の各細胞組織の成長を刺激する種々の成長因子が含有されることが考えられる。量的に入手しやすいウシ新生

(Dijke et al., Biotechnology vol.7, p.793～798, 1989).

Especially, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) and PDGF (platelet-derived growth factor) propagate a fibroblast. A cell is induced to the damage site and promoting recoverability of a wound is known. However, the report that a fibroblast was propagated or an effect was in a wound treatment was not made in the fragment 1\*2 of a kininogen until now.

#### [0010]

##### 【PROBLEM ADDRESSED】

Therefore, the subject of this invention is providing the peptide which can be used as new therapeutic agent which is effective to a wound treatment.

It is also considered that the bioactive substance which has a multiple functions in itself like TGF- $\beta$  and PDGF the wound therapeutic effect known conventionally was suggested in more detail, saying has the effect other than a wound treatment, which is not desirable.

Therefore, to use the peptide which does not have such secondary activity but acts on a wound treatment specifically more for this objective was desired.

#### [0011]

##### 【SOLUTION OF THE INVENTION】

It is possible that the various growth factor which stimulates the growth of each cellular organization of the fetus and the neonate with the remarkable growth is contained in the blood of the fetus of a mammal animal including a human, and the neonate.

Purification and separation of the protein factor

児血清を出発原料として、新たな線維芽細胞増殖活性を有する蛋白因子の精製分離を試みた。線維芽細胞増殖活性測定のために、例えば、Balb / 3T3細胞株が使用できる。

which has new fibroblast propagation activity was tried by making into a starting material the newborn bovine serum which is easy to acquire quantitatively.

For a fibroblast propagation activity measurement, for example, Balb / 3T three cell strains can be used.

#### [0012]

種々の成長因子は、ヘパリンに結合しやすいことが知られていたので、まず、ヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィでカラムに結合する画分を分離し、ついで逆相液体クロマトグラフにより、さらに細かい画分に分けることができる。これらの各画分について線維芽細胞増殖活性を測定した。こうして得られた活性画分のひとつについて、N末端のアミノ酸配列及びアミノ酸組成を決定し、蛋白質及び遺伝子配列データベースと参照して公知の蛋白質であるかどうか調べた。

#### [0012]

Since it was known that it will be easy for various growth factors to bond with a heparin, separate first the fraction bonded with a column with heparin affinity column chromatography, subsequently, it can divide into a further fine fraction by the reversed phase liquid chromatograph.

Fibroblast propagation activity was measured about each of these fractions.

In this way, about the one of the obtained active fraction, the amino acid sequence and amino acid composition of N terminal are determined, it referred with the protein and the gene-sequence data base, and investigated whether it was a well-known protein.

#### [0013]

その結果、公知のウシHMW-キニノーゲンのアミノ酸配列の一部、すなわちフラグメント1・2のN末端からのアミノ酸配列に一致した。更に、アミノ酸組成分析により、この活性画分は塩基性のウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2であることが同定された。

#### [0013]

Consequently, it was in agreement with one part of the well-known amino acid sequence of a cow HMW-kininogen, i.e., an amino acid sequence, from N terminal of a fragment 1\*2.

Furthermore, it was identified by amino-acid-composition analysis that this active fraction is the fragment 1\*2 of a basic cow HMW-kininogen.

#### [0014]

このフラグメント1・2は更にウシのカリクレイン様プロテアーゼにより、フラグメント1とフラグメント2に分解することが知られている。これらの分解フラグメントについても、いずれも極めて塩基性の高いアミノ酸残基、中でもヒスチジンに富

#### [0014]

Decomposing this fragment 1\*2 into a fragment 1 and a fragment 2 by the kallikrein-like protease of a cow further is known.

Also about these decomposition fragments, since each has a very basic high amino acid residue and the characteristic primary structure which was rich in histidine among them, having fibroblast propagation activity like the original

んだ特徴的な一次構造を有していることから、元のフラグメント1・2と同様に線維芽細胞増殖活性を有することが強く示唆される。より短い活性フラグメントは安定性及び吸収性が高いことが期待され、また、合成もしやすいことから薬剤としてより優れていると考えられる。

#### [0015]

ヒトHMW-キニノーゲンについては、カリクレイン様プロテアーゼにより、ウシHMW-キニノーゲンのようなフラグメント1・2が生ずることはない。しかし、ヒトHMW-キニノーゲンの最初のメチオニン残基を1番目としたときの390番目のセリン残基から510番目のリジン残基に至るペプチドフラグメントはウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2に対応する。さらに、ヒトHMW-キニノーゲンの390番目のセリン残基から457番目のアルギニン残基及び458番目のグリシン残基から520番目のリジン残基に至るペプチドフラグメントはフラグメント1・2の分解フラグメントである、ウシのフラグメント1及びフラグメント2に対応する。各々のヒトHMW-キニノーゲンフラグメントともヒスチジン残基に富み且つその他のリジン、アルギニンといった塩基性アミノ酸残基にも富んでいるという、ウシフラグメント1・2及びその分解フラグメントによく似た特性を有している。

#### [0016]

このために、これらのヒトHMW-キニノーゲンのウシフラグメント1・2様ペプチドフラグメントも創傷治

fragment 1\*2 is suggested strongly.

It is anticipated that a shorter active fragment will have high stability and absorption, moreover, since it is easy to carry out synthesis, it is thought that it excels as a medical agent.

#### [0015]

About a human HMW-kininogen, a fragment 1\*2 like a cow HMW-kininogen does not arise by kallikrein-like protease.

However, the peptide fragment from the 390th serine residue to the 510th lysine residue when making the methionine residue of the beginning of a human HMW-kininogen into the 1st is corresponded to the fragment 1\*2 of a cow HMW-kininogen.

Furthermore, the peptide fragments from the 390th serine residue to the 457th arginine residue and from the 458th glycine residue to the 520th lysine residue of a human HMW-kininogen correspond to the fragment 1 and fragment 2 of a cow, which are decomposition fragments of a fragment 1\*2.

It has the property just like the cow fragment 1\*2 and its decomposition fragment that each human HMW-kininogen fragment is rich in a histidine residue, and it is rich also in basic amino acid residues, such as another lysine and arginine.

#### [0016]

For this reason, the cow fragment 1\*2 -like peptide fragment of these human HMW-kininogens also has an effect in a wound

療に効果がある。ただし、これらヒトのウシフラグメント1・2様ペプチドは天然型では血中に分泌されないので、これらのペプチドを化学的に合成するか、これらのペプチドをコードする遺伝子を合成して遺伝子工学的方法により生産する。

#### [0017]

他の哺乳類に関しても、ウシ型HMW-キニノーゲンのようにフラグメント1・2を生ずる場合は、天然原料からの精製により、ヒト型の場合は合成等により、目的のペプチドフラグメントを得ることができる。

#### [0018]

これらのペプチドフラグメントは、線維芽細胞増殖作用を失わせずに、若干のアミノ酸残基の変更や化学修飾を加えることにより、更に製剤に適したペプチドとなることが期待できる。

#### [0019]

これらのペプチドは、水溶性が高く、創傷治療には適当な水溶性基剤と混合して局所的に直接幹部に塗布する投与法が最もふさわしいが、その他にも全身性投与として、静脈内注射剤又は皮下投与剤として投与することができ、また、微粒子のエアロゾル製剤として、経鼻又は経肺的に投与することができる。

#### [0020]

投与量は、局所投与では1～100 $\mu\text{g}$ ／投与部位／人／日、また全身性投与では0.1～10mg/kg／日を投与する。

treatment.

However, since these humans' cow fragment 1\*2 -like peptide is not secreted blood by the natural type, it synthesizes these peptides chemically or synthesizes the gene, which codes these peptides, and produces it by the genetic engineering-method.

#### [0017]

Also about the other mammal, the target peptide fragment can be obtained by the purification from a natural raw material when producing a fragment 1\*2 like a cow type HMW-kininogen, and by synthesis etc. in the case of a human-type.

#### [0018]

These peptide fragments can anticipate becoming a peptide suitable for a formulation further by adding alteration and chemical modification of some amino acid residue, without losing a fibroblast proliferative effect.

#### [0019]

These peptides have a high water solubility and its administering method which mixes with the suitable water-soluble base for a wound treatment, and is locally applied to wounded part directly is the most suitable.

However, in addition to this, it can administer as an intravenous-injection agent or a subcutaneous-administration agent as a systemic administration, moreover, it can administer on a per nasal or a transpulmonary target as an aerosol formulation of a microparticle.

#### [0020]

A dosage administers 1-100 microgram / administration site / human /day in a local administration, and administers a 0.1 to 10-mg/kg /day in a systemic administration.

**[0021]**

以下に実施例により、本発明を更に詳しく説明する。

**[実施例]**

実施例1 ウシの新生児血清よりの線維芽細胞(Balb／3T3細胞)増殖促進因子の精製

1) ヘパリンアフィニティクロマトグラフィー法による粗精製  
 ウシ新生児血清( GIBCO Laboratories 社より購入)1リットルに塩化ナトリウムを20.5g加える。この新生児血清を、あらかじめトリス緩衝液A(20mM Tris-HCl pH7.5, 0.5M NaCl)で平衡化しておいたヘパリントヨパールカラム(5cm × 5.5cm, 東ソー社)に流速3ml／分で展開する。その後、トリス緩衝液Aで同カラムを充分に洗浄する。洗浄後、ヘパリントヨパールカラムに吸着したペプチド又は蛋白質をトリス緩衝液B(20mM Tris-HCL pH7.5, 1.0M NaCl)で溶出する。溶出液は吸光度光度計を用い、280nmの吸光度によりモニターし、吸収度の高い画分、約300mlを採取した。

**[0022]**

2) 逆相液体クロマトグラフィー法による精製

操作1)で得た溶出液を、あらかじめ0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を含有する水で平衡化しておいたコスモシール5C18-300カラム(4.6 × 250mm、ナカライテスク社)に展開し、0.1%TFAを含む水で十分に洗浄した。その後、吸着したペプチド又は蛋白質をア

**[0021]**

An Example demonstrates this invention in more detail below.

**[Example]****Example 1**

Purification of the fibroblast (Balb / 3T three cells) growth promotion factor from the neonate blood serum of a cow

1) Crude refined based on the heparin affinity chromatography method

20.5g of sodium chloride is added to 1 liter (it purchased from GIBCO Laboratories) of newborn bovine serums.

This neonate blood serum is developed by 3 ml/min of the flow rates in the heparin-Toyopearl column (5 cm \* 5.5 cm and Tosoh Corporation CORP.) beforehand equilibrated by tris-buffers A (20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M NaCl).

After that, this column is sufficiently washed by tris-buffers A.

The peptide or protein adsorbed in the heparin-Toyopearl column is eluted after washing by tris-buffers B (20mM Tris-HCL pH 7.5, 1.0M NaCl).

An eluate is monitored with the absorbance of 280 nm using an absorbance photometer, and the fraction with a high absorbance was collected about 300 ml.

**[0022]**

2) Purification by the reversed-phase-liquid-chromatography method

It develops in the Cosmo seal 5 C18-300 column (4.6\*250 mm, NACALAI TESQUE, INC) which equilibrated the eluate obtained by operation 1 with the water which contains 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA) beforehand, the water which contains TFA 0.1% fully washed.

After that, the adsorbed peptide or protein was eluted by the linear gradient of 0 to 80% acetonitrile concentration.

An eluate is monitored with the absorbance of

セトニトリル濃度にして0~80%のリニアグラジェントにより溶出した。溶出液は、214nmの吸光度によりモニターし、ピークごとに採取した。溶出パターンを図1に示す。

#### [0023]

**実施例2 線維芽細胞増殖促進活性の測定**  
 線維芽細胞株のBalb／3T3細胞(ATCCより購入)を96ウェル培養プレートに1ウェル当たり $5 \times 10^3$ 個播種し、10%仔牛血清添加ダルベーコ改変イーグルMEM培地(以下DME)100  $\mu$ lを加え、培養器中で24時間、37°Cで培養した。その後培養液を除き、細胞を洗净後、低血清培地(0.2%仔牛血清添加DME)100  $\mu$ lを加え、更に3日間培養した。そこへ実施例1により得た各画分を10  $\mu$ l加え、15時間培養した。ついで、 $^3$ H-チミジンを74KBq/mlによう加え、6時間培養した。培養後培地を除き、細胞を集め細胞中に取込まれた $^3$ H-チミジンの量を測定した。その結果、図1中のピーク1(矢印)の画分に細胞増殖促進活性が認められた。

214 nm, it collected for every peak.  
 An elution pattern is shown in FIG. 1.

#### [0023]

##### Example 2 Measurement of fibroblast growth promotion activity

Balb / 3T three cells of a fibroblast strain (it purchased from ATCC) are seeded on 5\*10<sup>3</sup> piece per one well in 96 well culture plate, 10-% calf blood serum addition Dulbecco's modified Eagle's-minimum-essential-medium culture medium (henceforth, DME) 100 microliter was added, and it cultivated at 37 degrees-Celsius in the incubator for 24 hours.

After that, remove the culture solution, low blood serum culture medium (0.2-% calf blood serum addition DME) 100 microliter was added after washing a cell, and it cultivated for three more days.

Each fraction obtained by Example 1 was added 10 microliters, and was cultivated there for 15 hours.

Subsequently, 3H-thymidine was added so that it might be set to 74 KBq/ml, it cultivated for 6 hours.

The amount of the 3H-thymidine which was received in the cell was measured, after collecting cells by removing the culture medium after cultivating.

Consequently, cell growth promotion activity was accepted in the fraction of the peak 1 (arrow head) in FIG. 1.

#### [0024]

##### 実施例3 ピーク1のペプチドの物理化学的性質の測定

1) N末端アミノ酸配列分析  
 実施例2で活性が確認された画分のペプチドにつき、N末端配列をアミノ酸シーケンサー、モデル477A(アプライタバイオシステムズ社)により分析したところ、下に

#### [0024]

##### Example 3 Measurement of physicochemical character of the peptide of a peak 1

1) N terminal amino-acid-sequence analysis  
 When amino acid sequencer and model 477A (Applied Biosystems company) analyzed N terminal sequence about the peptide of a fraction with which activity was confirmed in Example 2, the amino acid sequence shown

示すアミノ酸配列が確認された。この配列を蛋白データベースにより、一致するものがあるか否かを調べたところ、ウシのHMW-キニノーゲンの387番目から406番目の配列と、アミノ酸が同定できなかった397番目、398番目及び404番目を除いて一致していることが確認された。表1にウシHMW-キニノーゲンの387番目から404番目のアミノ酸部分配列と確認されたアミノ末端配列を示す。

[0025]

【表1】

downward was confirmed.

When it investigated whether there would be any match with a protein database about this sequence, it was confirmed except for the 387th to the 406th sequence of the HMW-kininogen of a cow, and the 397th, the 398th, and the 404th which were not able to identify an amino acid that it is in agreement.

The amino-terminus sequence confirmed to Table 1 as it is the 387th to the 404th amino acid partial sequence of a cow HMW-kininogen is shown.

[0025]

[Table 1]

本活性画分	S V Q V M K T E G S . x x V S L P H x A M
	V
387	406
ウシキニノーゲン(部分)	S V Q V M K T E G S T P V S L P H S A M
	T V

Table 1 (top to bottom)

Active fraction, Kininogen of a cow (part)

[0026]

この表1の本活性画分においてxで示された、397、398及び404番目のアミノ酸残基は、糖の側鎖を有することが報告されているアミノ酸であり、そのことにより、アミノ酸シークエンサーによるアミノ酸残基の同定ができなかったと考えられる。また、本実験においては401番目はロイシン及びバリンの両方の可能性があるという結果を得たが、この401番目及び他の398

[0026]

397,398 and the 404th amino acid residue which were shown by x in this active fraction of this Table 1 are an amino acid it is reported that it is to have the side chain of saccharide.

It is thought that the identification of the amino acid residue by the amino acid sequencer was not completed by that.

Moreover, in this experiment, the 401st obtained the result that there was possibility of both a leucine and valine.

However, regarding the 401st amino acid residue and the other 398th and 455th amino

番目と455番目のアミノ酸残基に関しては、ウシHMW-キニノーゲンについて、それぞれ、文献的に2種のアミノ酸が報告されている残基である（Kato H. et al., Methods Enzymol. vol. 80, p.172～198, 1981）。

acid residue, about a cow HMW-kininogen, it is respectively the residue to which two sorts of amino acids are reported in reference.

(Kato H. et al., Methods Enzymol. vol. 80, p.172-198, 1981).

### 【0027】

#### 2) アミノ酸組成分析

また、ピーク1の画分のペプチドをアミノ酸分析機により、アミノ酸組成を調べたところ、ウシのHMW-キニノーゲンの387番目から496番目のフラグメント、すなわちフラグメント1・2のアミノ酸組成に一致した。表2にアミノ酸組成分析の結果を示す。

### 【0028】

### 【表2】

### [0027]

#### 2) Amino-acid-composition analysis

Moreover, in the peptide of the fraction of a peak 1, when the amino acid composition was investigated, it was in agreement with the 387th to the 496th fragment of the HMW-kininogen of a cow, i.e., the amino acid composition of a fragment 1\*2, with the amino-acid-analysis machine.

The result of an amino-acid-composition analysis is shown in Table 2.

### [0028]

### [Table 2]

アミノ酸	本件分析結果	理論値(*1)
Asp/Asn	8.2	8
Glu/Gln	10.6	11
Ser	7.2	7
Gly	22.0	22
His	21.7	22
Arg	3.3	3
Thr	3.8	4
Ala	1.6	1
Pro	3.4	3
Tyr	1.4	1
Val	3.7	4
Met	1.9	2
1/2Cys	0.0	0
Ile	0.9	1
Leu	5.5	6
Phe	0.0	0
Lys	12.6	13
Trp	N.D.(*2)	2
合計		110

Table 2

Row (left to right): Amino acid, Result of analysis in this case, Reference value (\*1)

Column (bottom): Total

\* 1 Han.Y.N. et.al. \*1 Han.Y.N. et.al.J.Biochem.vol.83 and  
J.Biochem. vol.83, p.213 ~ p.213-221 (1978)  
221(1978)より \*2 Undecided

\* 2 未決定

### [0029]

3) 電気泳動による分析  
ピーク1のペプチドの分子量を還元条件下のSDS電気泳動により確認したところ、約21Kdの分子量を示した。この分子量は報告されているウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2の分子量と一致する ( Han.Y.N. et.al.

### [0029]

3) The analysis by the electrophoresis  
When the molecular weight of the peptide of a peak 1 was confirmed according to the SDS electrophoresis of a reduction condition, the molecular weight of about 21 Kd(s) was shown. This molecular weight corresponds with the molecular weight of the fragment 1\*2 of a cow HMW-kininogen reported. (Han.Y.N. et. al. J.Biochem.vol.79,p.1201 - 1222,1976).

J.Biochem. vol.79, p.1201 ~  
1222, 1976).

**[0030]**

以上、表1、2及び3)に示された結果より、線維芽細胞の増殖活性を有するピーク1のペプチドはウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2であると確認された。

**[0031]**

実施例4 ウシHMW-キニノーゲンからのフラグメント1・2、1及び2の調製

1) ウシHMW-キニノーゲンからのフラグメント1・2の調製  
 フラグメント1・2の調整は Han の方法 (J. Biochem vol.83, p.213~221, 1978) に従って行った。ウシHMW-キニノーゲン (生化学工業より購入) 5mgを0.2M炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH8.0) 50 μlに溶解し、ウシ血漿カリクレイン4.5 μgを加え、37°Cにて1時間加温した。その後、D F P (Diisopropyl phosphothioride)を最終濃度1.7 × 10<sup>-2</sup>Mになるように加え、反応を停止した。これを、0.2M炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH8.0) で平衡化したセファデックスG-75カラム(1.6×60cm)にてゲルろ過を行い、フラグメント1・2を得た。

**[0032]**

2) フラグメント1、フラグメント2の調製  
 フラグメント1及びフラグメント2の調整は Han の方法 (文献上述) に従って行った。即ち、1)で得られたフラグメント1・2にウシ血漿カ

**[0030]**

As mentioned above, from the result shown by Table 1, 2 and 3, the peptide of the peak 1 which has propagation activity of a fibroblast was confirmed as it is the fragment 1\*2 of a cow HMW-kininogen.

**[0031]**

Example 4 Manufacture of a fragment 1\*2, and 1 and 2 from a cow HMW-kininogen

1) Manufacture of the fragment 1\*2 from a cow HMW-kininogen

Manufacture of a fragment 1\*2 followed Han's and others method (J.Biochem vol.83,p.213 - 221,1978).

Cow HMW-kininogen (it purchased from Seikagaku) 5 mg is dissolved in 0.2M ammonium hydrogencarbonate buffer (pH8.0) 50 microliter, cow plasma kallikrein 4.5 microgram was added and it heated at 37 degrees-Celsius for 1 hour.

After that, in addition, reaction was stopped so that DFP (Diisopropylphosphothioride) might be set to final-concentration 1.7\*10<sup>-2</sup>M.

The gel filtration was performed in sephadexG-75 column (1.6\*60 cm) which equilibrated this with 0.2M ammonium hydrogencarbonate buffer (pH8.0), and the fragment 1\*2 was obtained.

**[0032]**

2) Manufacture of a fragment 1 and a fragment 2

Manufacture of a fragment 1 and a fragment 2 was performed according to Han's and others method (reference above-mentioning).

That is, a cow plasma kallikrein is made to react with the fragment 1\*2 obtained by 1 so that it

リクレインを重量比1／1100にならうに反応させ、フラグメント1とフラグメント2に断片化した。DFPにより反応を停止した後、反応液から、0.2M炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-75カラム(1.6×60cm)にてゲルろ過を行うことにより、それぞれフラグメント1、フラグメント2を得た。

#### 【0033】

実施例5 ウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2の線維芽細胞増殖活性の測定  
実施例4により得たフラグメント1・2を、実施例2の方法に従い、各ウェル当たり0.03～10μg/mlになるように加え、<sup>3</sup>H-チミジンの取込みを測定した。フラグメント1・2の線維芽細胞増殖活性の測定の結果を表3に示す。各カラムは各群の平均と標準偏差を示す。t検定により、対照群に対して、\*はp<0.05で、また\*\*はp<0.001で有意差がみられたことを示す。

#### 【0034】

#### 【表3】

may become at weight-ratio 1/1100.  
It fragmentized to the fragment 1 and the fragment 2.

After stopping reaction by DFP, the fragment 1 and the fragment 2 were obtained from the reaction solution, respectively by performing the gel filtration in sephadexG-75 column (1.6\*60 cm) equilibrated with 0.2M ammonium hydrogencarbonate buffer (pH8.0).

#### [0033]

Example 5 Measurement of fibroblast propagation activity of the fragment 1\*2 of a cow HMW-kininogen

The method of Example 2 is followed in the fragment 1\*2 obtained by Example 4, it adds so that it may be set to 0.03 to 10 microgram/ml per each well, the reception of <sup>3</sup>H-thymidine was measured.

The result of a measurement of fibroblast propagation activity of a fragment 1\*2 is shown in Table 3.

Each column shows an average and standard deviation of each group.

By the t test, \* is p< 0.05 to a control group, moreover, \*\* is at p< 0.001.

It shows that the significant difference was seen.

#### 【0034】

#### [Table 3]

添加化合物	用量(μg/ml)	<sup>3</sup> H-チミジンの取込み(cpm)
対照群	-	437.0±57.4
フラグメント1・2	0.3	561.6±49.7*
	1.0	1252.9±122.6*
	3.0	3186.4±451.7**
	10.0	8299.4±510.9**

Table 3

Row (left to right): Compound added, Dosage (microgram/ml), Reception of 3H-thymidine (cpm)

Column (top to bottom): Control, Fragment 1\*2

この結果から、ウシHMW-キニノーゲンフラグメント1・2は用量依存的に細胞増殖促進活性を有することが確認された。

From this result, it was confirmed that the cow HMW-kininogen fragment 1\*2 has cell growth promotion activity dose dependently.

【0035】

[0035]

## 【効果】

本発明により提供されるHMW-キニノーゲンのフラグメント1、フラグメント2及びフラグメント1・2は線維芽細胞の増殖促進活性を有するので創傷治療剤として有用である。

## [EFFECTS]

Since the fragment 1, the fragment 2, and fragment 1\*2 of a HMW-kininogen which are provided by this invention have growth promotion activity of a fibroblast, they are useful as a wound healing agent.

【0036】

[0036]

## 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 110

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

起源:

生物名: ウシ(Bos taurus)

組織の種類: 血清

配列の特徴:

存在位置: ウシHMW-キニノーゲンの387~496番目のペプチド

フラグメント

他の情報: 12番目の Xaa は、Pro

又は Thr、15番目の Xaa は、Val

又は Leu、69番目の Xaa は、Lys

又は Arg を示す。

## [Sequence table]

Sequence number: 1

Sequence length: 110

Sequence type: Amino acid

Topology: Linear

Type of sequence: Peptide

Fragment type: Intermediate-part fragment

Origin :

Organism name: Cow (Bos taurus)

The kind of tissue: Blood serum

Sequence characteristics :

Location: The 387 to 496th peptide fragment of a cow HMW-kininogen

Other information: 12th Xaa shows Pro or Thr.

15th Xaa shows Val or Leu.

69th Xaa shows Lys or Arg.

Sequence :

SerValGlnValMetLysThrGluGlySerThrXaaValSe

rXaaPro

1

5

10

配列:

Ser	Val	Gln	Val	Met	Lys	Thr	Glu		15	
Gly	Ser	Thr	Xaa	Val	Ser	Xaa				HisSerAlaMetSerProValGlnAspGluGluArgAspS
Pro									20	erGlyLys
1									25	
10									30	
His	Ser	Ala	Met	Ser	Pro	Val	Gln		35	GluGlnGlyProThrHisGlyHisGlyTrpAspHisGlyLy
Asp	Glu	Glu	Arg	Asp	Ser	Gly			40	sGlnIle
Lys									45	
									50	LysLeuHisGlyLeuGlyLeuGlyHisLysHisLysHisAs
25									55	pGlnGly
Glu	Gln	Gly	Pro	Thr	His	Gly	His		60	
Gly	Trp	Asp	His	Gly	Lys	Gln	Ile		65	HisGlyHisHisXaaSerHisGlyLeuGlyHisGlyHisGI
									70	nLysGln
35									75	
40									80	HisGlyLeuGlyHisGlyHisLysHisGlyHisGlyHisGly
Lys	Leu	His	Gly	Leu	Gly	Leu			85	LysHis
Gly	His	Lys	His	Lys	His	Asp	Gln		90	
Gly									95	
50									100	LysAsnLysGlyLysAsnAsnGlyLysHisTyrAspTrpA
60									105	rg
His	Gly	His	His	Xaa	Ser	His	Gly		110	
Leu	Gly	His	Gly	His	Gln	Lys	Gln			
65										
70										
75										
80										
His	Gly	Leu	Gly	His	Gly	His	Lys			
His	Gly	His	Gly	His	Gly	Lys	His			
85										
90										
95										
Lys	Asn	Lys	Gly	Lys	Asn	Asn				
Gly	Lys	His	Tyr	Asp	Trp	Arg				
100										
105										
110										

## 【0037】

配列番号:2  
 配列の長さ:69  
 配列の型:アミノ酸  
 トポロジー:直鎖状  
 配列の種類:ペプチド  
 フラグメント型:中間部フラグメント  
 起源:  
 生物名:ウシ(Bos taurus)  
 組織の種類:血清  
 配列の特徴:  
 存在位置:ウシHMW-キニノ-

## 【0037】

Sequence number: 2  
 Sequence length: 69  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Fragment type: Intermediate-part fragment  
 Origin :  
 Organism name: Cow (Bos taurus)  
 The kind of tissue: Blood serum  
 Sequence characteristics :  
 Location: The 387 to 455th peptide fragment of  
 a cow HMW-kininogen  
 Other information: 12th Xaa shows Pro or Thr,



Ser His Gly Leu Gly His Gly His	15		
Gln Lys Gln His Gly Leu Gly His		GlyHisLysHisGlyHisGlyHisGlyLysHisLysAsnLys	
1	5	GlyLys	
10	15	20	25
Gly His Lys His Gly His Gly His		30	
Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys		AsnAsnGlyLysHisTyrAspTrpArg	
20		35	40
25	30		
Asn Asn Gly Lys His Tyr Asp			
Trp Arg			
35			
40			

## 【0039】

配列番号:4  
 配列の長さ:131  
 配列の型:アミノ酸  
 トポロジー:直鎖状  
 配列の種類:ペプチド  
 フラグメント型:中間部フラグメント  
 起源:  
 生物名:ヒト(Homo sapiens)  
 組織の種類:血清  
 配列の特徴:  
 存在位置:ヒトHMW-キニノーゲンの390~520番目のペプチドブ

ラグメント			
配列:			
Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys	15		
Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro			
1	5		10
10	15		
His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln	20		25
Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly			
Lys	30		
20			
25	30		
Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His			
Asp Trp Gly His Glu Lys Gln			
Arg	35		
40	45		
Lys His Asn Leu Gly His Gly His			
Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His	65		70
50	55	75	80

## 【0039】

Sequence number: 4  
 Sequence length: 131  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Fragment type: Intermediate-part fragment  
 Origin :  
 Organism name: Human (Homo sapiens)  
 The kind of tissue: Blood serum  
 Sequence characteristics :  
 Location: The 390 to 520th peptide fragment of a human HMW-kininogen  
 Sequence :

SerSerArgIleGlyGlulleLysGluGluThrThrValSerProPro  
 1 5 10  
 15  
 HisThrSerMetAlaProAlaGlnAspGluGluArgAspSerGlyLys  
 5 10  
 20 25  
 30  
 GluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrpGlyHisGluLysGlnArg  
 35 40  
 45  
 LysHisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspGlnGlyHis  
 50 55  
 60  
 40 45  
 GlyHisGlnArgGlyHisGlyLeuGlyHisGlyHisGluGlnGlyHis  
 55 65  
 70  
 75 80

60		GlyLeuGlyHisGlyHisLysPheLysLeuAspAspAsp
Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu		LeuGluHis
Gly His Gly His Glu Gln Gln His	85	90
65	70	95
75	80	GlnGlyGlyHisValLeuAspHisGlyHisLysHisLysHis
Gly Leu Gly His Gly His Lys		GlyHis
Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu	100	105
Glu His		110
85		GlyHisGlyLysHisLysAsnLysGlyLysLysAsnGlyLy
90	95	sHisAsn
Gln Gly Gly His Val Leu Asp His	115	120
Gly His Lys His Lys His Gly His	125	
100		GlyTrpLys
105	110	130
Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys		
Gly Lys Lys Asn Gly Lys His		
Asn		
115		
120	125	
Gly Trp Lys		
130		

## 【0040】

配列番号:5  
 配列の長さ:68  
 配列の型:アミノ酸  
 トポロジー:直鎖状  
 配列の種類:ペプチド  
 フラグメント型:中間部フラグメント  
 起源:  
 生物名:ヒト(Homo sapiens)  
 組織の種類:血清  
 配列の特徴:  
 存在位置:ヒトHMW-キニノーゲンの390~457番目のペプチドプロラグメント  
 配列:  
 Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys  
 Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro  
 1 5  
 10 15  
 His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln  
 Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly  
 Lys 20  
 20

## [0040]

Sequence number: 5  
 Sequence length: 68  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Fragment type: Intermediate-part fragment  
 Origin :  
 Organism name: Human (Homo sapiens)  
 The kind of tissue: Blood serum  
 Sequence characteristics :  
 Location: The 390 to 457th peptide fragment of a human HMW-kininogen  
 Sequence :  
 SerSerArgIleGlyGlulleLysGluGluThrThrValSerProPro  
 1 5 10  
 15  
 HisThrSerMetAlaProAlaGlnAspGluGluArgAspSerGlyLys 25  
 20  
 30  
 GluGlnGlyHisThrArgArgHisAspTrpGlyHisGluLysGlnArg 35 40

25	30	45
Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His		LysHisAsnLeuGlyHisGlyHisLysHisGluArgAspG
Asp Trp Gly His Glu Lys Gln		nGlyHis
Arg		50
	35	60
40	45	GlyHisGlnArg
Lys His Asn Leu Gly His Gly His		65
Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His		
	50	55
60		
Gly His Gln Arg		
	65	

## 【0041】

配列番号:6  
 配列の長さ:63  
 配列の型:アミノ酸  
 トポロジー:直鎖状  
 配列の種類:ペプチド  
 フラグメント型:中間部フラグメント  
 起源:  
 生物名:ヒト(Homo sapiens)  
 組織の種類:血清  
 配列の特徴:  
 存在位置:ヒトHMW-キニノーゲンの458~520番目のペプチドフラグメント  
 配列:  
 Gly His Gly Leu Gly His Gly His  
 Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His  
 1 5  
 10 15  
 Gly His Lys Phe Lys Leu Asp  
 Asp Asp Leu Glu His Gln Gly  
 Gly His  
 20  
 25 30  
 Val Leu Asp His Gly His Lys His  
 Lys His Gly His Gly His Gly Lys  
 35  
 40 45  
 His Lys Asn Lys Gly Lys Lys  
 Asn Gly Lys His Asn Gly Trp  
 Lys  
 50 55

## 【0041】

Sequence number: 6  
 Sequence length: 63  
 Sequence type: Amino acid  
 Topology: Linear  
 Type of sequence: Peptide  
 Fragment type: Intermediate-part fragment  
 Origin :  
 Organism name: Human (Homo sapiens)  
 The kind of tissue: Blood serum  
 Sequence characteristics :  
 Location: The 458 to 520th peptide fragment of a human HMW-kininogen  
 Sequence :  
 GlyHisGlyLeuGlyHisGlyHisGluGlnGlnHisGlyLeuGlyHis  
 1 5 10  
 15  
 GlyHisLysPheLysLeuAspAspAspLeuGluHisGln  
 5 GlyGlyHis  
 20 25  
 30  
 ValLeuAspHisGlyHisLysHisLysHisGlyHisGlyHis  
 GlyLys  
 35 40  
 45  
 HisLysAsnLysGlyLysLysAsnGlyLysHisAsnGlyTrpLys  
 50 55  
 60

## 【図面の簡単な説明】

## [BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]

## 【図1】

ヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフに結合し、溶出された画分をさらに、逆相液体クロマトグラフィーにより展開したパターンを示す。矢印は本件のフラグメント1・2を含む活性画分である。

## 【図1】

## [FIG.1]

It bonds with a heparin affinity column-chromatography, the pattern which further developed the fraction which it eluted by the reversed phase liquid chromatography is shown.  
An arrow head is an active fraction containing the fragment 1\*2 in this case.

## [FIG.1]

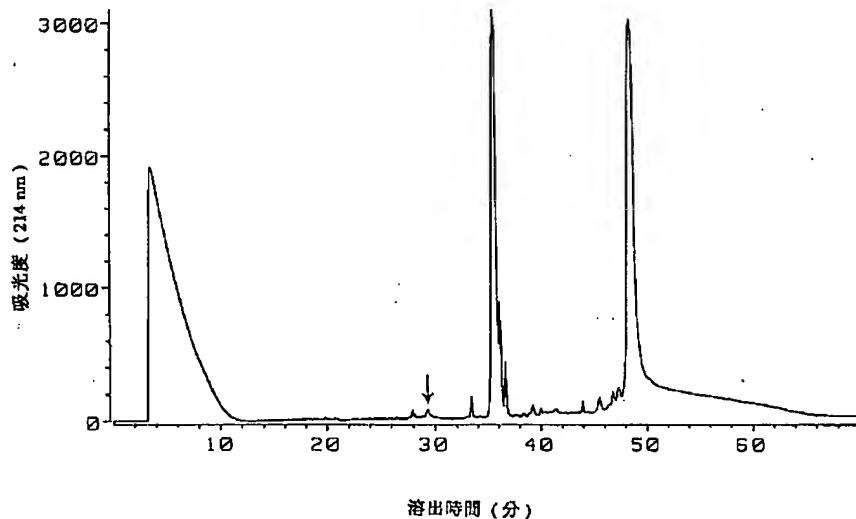


Figure 1

Vertical axis: Absorbance (214nm),  
Elution time (minute)

## DERWENT TERMS AND CONDITIONS

*Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.*

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

"WWW.DERWENT.CO.UK" (English)  
"WWW.DERWENT.CO.JP" (Japanese)